

PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/82, 15/29, A01H 5/00	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 96/13595 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 9. Mai 1996 (09.05.96)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP95/04257 (22) Internationales Anmeldedatum: 30. Oktober 1995 (30.10.95) (30) Prioritätsdaten: P 44 39 748.8 31. Oktober 1994 (31.10.94) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): INSTITUT FÜR GENBIOLOGISCHE FORSCHUNG BERLIN GMBH [DE/DE]; Ihnestrasse 63, D-14195 Berlin (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): LEGGEWIE, Georg [DE/DE]; Altstadt 19, D-57392 Schnallenberg (DE). RIESMEIER, Jörg [DE/DE]; Ludwigsfelder Strasse 18, D-14165 Berlin (DE). FROMMER, Wolf-Bernd [DE/DE]; Friedbergstrasse 45, D-14057 Berlin (DE). (74) Anwalt: VOSSIUS & PARTNER; Siebertstrasse 4, D-81675 München (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, HU, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(54) Title: PROCESSES FOR MODIFYING PLANT FLOWERING BEHAVIOUR (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR VERÄNDERUNG DES BLÜHVERHALTENS BEI PFLANZEN (57) Abstract <p>The invention concerns processes for growing plants whose flowering behaviour is modified in comparison with wild plant species, in particular for growing plants which flower early and to an increased extent. The invention also concerns the resultant plants and the use of DNA molecules which code saccharose carriers in order to modify the plant flowering behaviour.</p> (57) Zusammenfassung <p>Es werden Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit einem im Vergleich zu Wildtyppflanzen veränderten Blühverhalten, insbesondere einer vorzeitigen Blütenbildung und einem verstärkten Blütenansatz, und die daraus resultierenden Pflanzen beschrieben. Weiterhin wird die Verwendung von DNA-Molekülen, die Saccharosetransporter codieren, zur Veränderung des Blühverhaltens bei Pflanzen beschrieben.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MIR	Mauritanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

Verfahren zur Veränderung des Blühverhaltens bei Pflanzen

Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit einem im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen veränderten Blühverhalten, insbesondere einer vorzeitigen Blütenbildung und einem verstärkten Blütenansatz, sowie die aus dem Verfahren erhältlichen Pflanzen. Die Herstellung derartiger Pflanzen erfolgt hierbei durch die Steigerung der Saccharosentransporteraktivität in den Pflanzen. Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung von DNA-Molekülen, die Saccharosetransporter codieren, zur Veränderung des Blühverhaltens bei Pflanzen.

Die Blütenbildung ist in Pflanzen eine Voraussetzung für die sexuelle Fortpflanzung und ist daher essentiell für die Vermehrung von Pflanzen, die nicht auf vegetativem Wege vermehrt werden können, sowie für die Bildung von Samen und Früchten. Der Zeitpunkt, zu dem Pflanzen vom rein vegetativen Wachstum zur Blütenbildung übergehen, ist von zentraler Bedeutung beispielsweise in der Landwirtschaft, dem Gartenbau und der Pflanzenzüchtung. Ebenso ist die Anzahl der Blüten häufig von wirtschaftlichem Interesse, z.B. bei verschiedenen Nutzpflanzen (Tomate, Gurke, Zucchini, Baumwolle etc.), bei denen eine höhere Anzahl der Blüten unter Umständen einen höheren Ertrag bedeutet, oder bei der Herstellung von Zierpflanzen und Schnittblumen.

In vielen Anwendungsbereichen ist eine sehr frühzeitige Blütenbildung der Pflanzen von Vorteil. In der Landwirtschaft beispielsweise würde bei verschiedenen Nutzpflanzen eine vorzeitige Blüte eine Verkürzung der Zeit zwischen Aussaat und Ernte und so das Ausbringen von zwei Aussaaten pro Jahr ermöglichen bzw. eine Verlängerung des Zeitraums zwischen Blüte und Ernte, wodurch unter Umständen eine Ertragssteigerung erreicht werden kann. Auch in der Pflanzenzüchtung kann

eine vorzeitige Blütenbildung zu einer erheblichen Verkürzung der Züchtungsverfahren beitragen und so eine Verbesserung der Wirtschaftlichkeit bewirken. Der wirtschaftliche Nutzen einer vorzeitigen Blüte ist auch für den Gartenbau und die Zierpflanzenproduktion offensichtlich.

Die bisherigen Bemühungen zur Aufklärung der Mechanismen, die den Zeitpunkt der Blütenbildung in Pflanzen bestimmen, lassen keinen eindeutigen Schluß auf die beteiligten und ausschlaggebenden Faktoren zu. Für eine Reihe von Pflanzen ist bekannt, daß Umwelteinflüsse den Übergang zwischen vegetativem Wachstum und Blütenbildung bestimmen, z.B. Licht/Dunkel-Rhythmen, Temperatur und Wasserangebot. Wie diese Reize von der Pflanze aufgenommen und in physiologische Signale umgesetzt werden, die im apikalen Meristem die Blütenbildung induzieren, ist weitgehend unbekannt. Es werden verschiedene Theorien diskutiert und eine ganze Reihe von möglichen Faktoren in Betracht gezogen, wie beispielsweise Blühhormone (Florigen/Antiflorigen), Kohlenhydrate, Cytokinine, Auxin, Polyamine und Calcium-Ionen (Bernier et al., Plant Cell 5 (1993), 1147-1155).

Die Kontrolle des Zeitpunktes der Blütenbildung durch Regulation exogener Reize, wie beispielsweise Licht/Dunkel-Rhythmus, Temperatur oder Wasserangebot, läßt sich in der Praxis nur in begrenztem Umfang umsetzen, beispielsweise in Gewächshäusern. Um eine vorzeitige Blütenbildung in Pflanzen zu erreichen, die unter Freilandbedingungen wachsen, ist es daher notwendig, Pflanzen zu verwenden, die eine vorzeitige Blütenbildung unabhängig von exogenen Reizen zeigen. Möglichkeiten, derartige Pflanzen zu erzeugen, bestehen zum einen in Mutageneseverfahren, die jedoch nicht für alle Spezies anwendbar sind, in züchterischen Verfahren, die jedoch sehr zeitintensiv sind und für jede Pflanzenspezies gesondert durchgeführt werden müssen, oder in gentechnischen Verfahren. Voraussetzung für die Anwendbarkeit eines gentechnischen Verfahrens ist jedoch, daß zum einen Genloci identifiziert sind, die einen wesentlichen Einfluß auf den Blühzeitpunkt haben, und daß DNA-Sequenzen zur Verfügung stehen, die

die relevanten Produkte codieren. Dies ist bisher jedoch nicht der Fall.

Für die Spezies *Arabidopsis thaliana*, an der bisher die meisten Untersuchungen zur Regulation des Blühzeitpunktes durchgeführt wurden, wurden zwar verschiedene Mutanten beschrieben, die im Vergleich zu Wildtyppflanzen vorzeitig blühen (siehe Referenzen in Lee et al., Plant Cell 6 (1994), 75-83), jedoch konnten diese Mutanten bisher nicht näher charakterisiert werden. Die Aufklärung der biochemischen Ursachen, die zu der vorzeitigen Blütenbildung führt, gelang bisher ebenfalls nicht.

Bell et al., Plant Mol. Biol. 23 (1993), 445-451) beschreiben Tabakpflanzen, die mit der *cdc25*-cDNA aus *Schizosaccharomyces pombe* transformiert wurden und die als Folge der Expression dieses Mitose-induzierenden Proteins eine vorzeitige Blütenbildung und eine stark erhöhte Anzahl der Blüten zeigen. Diese Pflanzen weisen jedoch den Nachteil auf, daß es zu starken Veränderungen in der Blattmorphologie kommt. Insbesondere sind die Blätter dieser Pflanzen gerollt.

Dieses Verfahren scheint daher nicht geeignet zu sein, um Nutzpflanzen herzustellen, die in ihrem Blühverhalten verändert sind.

Zur Herstellung von intakten Pflanzen mit einer höheren Anzahl an Blüten pro Pflanze bzw. einer vorzeitigen Blütenbildung ist man daher heute nach wie vor auf die klassischen Züchtungsverfahren oder Mutageneseverfahren angewiesen.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, einfache Verfahren zur Verfügung zu stellen, die es ermöglichen, Pflanzen dahingehend zu verändern, daß sie in ihrem Blühverhalten verändert sind, insbesondere dahingehend daß sie eine vorzeitige Blütenbildung und/oder einen verstärkten Blütenansatz zeigen.

Diese Aufgabe wird durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen bezeichneten Ausführungsformen gelöst.

Gegenstand der Erfindung ist daher die Verwendung von DNA-Molekülen, die Proteine mit der biologischen Aktivität eines Saccharosetransporters codieren, zur Veränderung des Blühverhaltens bei Pflanzen.

In der veröffentlichten PCT-Anmeldung WO 94/00574 werden DNA-Sequenzen beschrieben, die Saccharosetransporter aus Spinat und Kartoffel codieren. In dieser Anmeldung wird auch die Möglichkeit erwähnt, diese Sequenzen in Verbindung mit DNA-Sequenzen für die Regulation der Transkription in Pflanzen einzubringen mit dem Ziel der Überexpression derartiger Saccharosetransporter. Die Verwendung von DNA-Sequenzen, die Saccharosetransporter codieren, zur Veränderung des Blühverhaltens bei Pflanzen wurde jedoch nicht beschrieben. Von dem Saccharosetransporter wird angenommen, daß er eine zentrale Rolle bei dem Transport von Saccharose, der wichtigsten Transportform der durch Photosynthese gebildeten Photoassimilate, aus den photosynthetisch aktiven Geweben in das Phloem spielt. In welchem Ausmaß er auch bei dem Transport von Saccharose aus dem Phloem in photosynthetisch nicht aktive Gewebe, die auf den Import von Photoassimilaten angewiesen sind (sogenannte "sink"-Organe) eine Rolle spielt, ist bisher umstritten (Riesmeier et al., Plant Cell 5 (1993), 1591-1598; Riesmeier et al., EMBO J. 13 (1994), 1-7).

Eine Funktion von Saccharosetransportern bei der Regulation des Blühverhaltens war bisher nicht in Erwägung gezogen worden. Zwar wurde Saccharose bereits mehrfach als potentiell Signal für die Blühinduktion im apikalen Meristem diskutiert (Bernier et al., Plant Cell 5 (1993), 1147-1155; Lejeune et al., Planta 190 (1993), 71-74; Lejeune et al., Plant Physiol. Biochem. 29 (1991), 153-157), einen Einfluß eines Saccharosetransporters auf das Blühverhalten als Folge einer erhöhten Aktivität dieses Transporters ist bisher jedoch weder bekannt und war auch aus verschiedenen Gründen nicht zu erwarten.

Es wurde überraschend gefunden, daß bei transgenen Pflanzen, in denen die Aktivität des Saccharosetransporters in den Geweben gesteigert war im Vergleich zu nicht-transformierten Pflanzen, ein verändertes Blühverhalten beobachtet werden kann. Unter einer gesteigerten Aktivität des Saccharosetransporters wird im Rahmen dieser Anmeldung verstanden, daß in den transgenen Pflanzen die Saccharosetransporteraktivität im Vergleich zu nicht-transformierten Pflanzen insgesamt erhöht ist, insbesondere um mindestens 30 %, vorzugsweise um mindestens 50 %, besonders bevorzugt um mindestens 100 %, und insbesondere um mindestens 200 %. Unter Saccharosetransportern werden Proteine verstanden, die in der Lage sind, Saccharose über biologische Membranen zu transportieren. Die Aktivität derartiger Transporter läßt sich nach der in Riesmeier et al. (EMBO J. 11 (1992), 4705-4713) beschriebenen Methode bestimmen. Unter einem veränderten Blühverhalten wird im Rahmen dieser Anmeldung verstanden, daß bei transformierten Pflanzen im Vergleich zu nicht-transformierten Pflanzen

- a) eine vorzeitige Blütenbildung und Blüte erfolgt, wobei vorzeitig bedeutet, daß die transformierten Pflanzen im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen mindestens einige Tage, vorzugsweise eine bis mehrere Wochen, insbesondere 1-2 Wochen früher Blüten bilden und blühen, und/oder
- b) einen verstärkten Blütenansatz zeigen, was bedeutet, daß die transformierten Pflanzen im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen durchschnittlich mehr Blüten pro Pflanze ansetzen, in der Regel mindestens 5 % mehr Blüten ansetzten, insbesondere 10-100 % und vorzugsweise 10-40 % mehr Blüten ansetzen.

Eine im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen gesteigerte Saccharoseransporteraktivität kann dadurch erreicht werden, daß in Pflanzen DNA-Moleküle eingeführt werden, die einen Saccharosetransporter codieren. Dadurch kommt es in den transgenen Zellen zur zusätzlichen Synthese von Proteinen mit Saccharo-

setransporteraktivität. Als Folge davon haben transformierte Gewebe, in denen das eingeführte DNA-Molekül exprimiert wird, eine im Vergleich zu nicht-transformierten Zellen gesteigerte Saccharosetransporteraktivität.

Um eine Steigerung der Saccharosetransporteraktivität in den Geweben von Pflanzen zu erreichen, wird vorzugsweise die codierende Region einer DNA-Sequenz, die einen Saccharosetransporter codiert, mit DNA-Sequenzen verknüpft, die für die Transkription in pflanzlichen Zellen erforderlich sind, und in Pflanzenzellen eingebracht. Bei den Regulationssequenzen, die für die Transkription erforderlich sind, handelt es sich zum einen um Promotoren und gegebenenfalls Enhancer-Elemente, die für die Initiation der Transkription verantwortlich sind. Ferner können gegebenenfalls Terminationssignale, die zur Termination der Transkription sowie zur Addition eines Poly-A-Schwanzes an das entstehende Transkript führen angefügt werden. Diese Sequenzen sind derart miteinander verknüpft, daß sich an das 3'-Ende des Promotors die codierende Region eines Saccharosetransportergens in sense-Orientierung anschließt, so daß eine mRNA synthetisiert wird, die in ein Protein mit der Aktivität eines Saccharosetransporters translatiert werden kann, und sich an das 3'-Ende der codierenden Region das Terminationssignal anschließt.

Ferner kann die codierende Region mit Sequenzen verknüpft sein, die die Translation in pflanzlichen Zellen steigern, wie in den Beispielen beschrieben.

Die DNA-Moleküle, die einen Saccharosetransporter codieren, können aus jedem beliebigen Organismus stammen, der derartige Sequenzen enthält, insbesondere aus jedem beliebigen prokaryontischen oder eukaryontischen Organismus. In einer bevorzugten Ausführungsform stammen die DNA-Moleküle aus Pflanzen, Pilzen oder Bakterien. Bei Pflanzen kommen wiederum vorzugsweise höhere Pflanzen, insbesondere monokotyle oder dicotyle Pflanzen in Frage. DNA-Moleküle, die Saccharo-

setransporter codieren, sind bereits aus verschiedenen Organismen bekannt und sind weiter unten angegeben. Diese werden bevorzugt im Rahmen der Erfindung verwendet.

Die Erfindung betrifft ebenfalls ein Verfahren zur Veränderung des Blühverhaltens bei Pflanzen, bei dem das veränderte Blühverhalten dadurch bewirkt wird, daß in Pflanzen die Aktivität des Saccharosetransporters erhöht wird.

Die Herstellung transgener Pflanzen, die im Vergleich zu nicht-transformierten Pflanzen ein verändertes Blühverhalten aufweisen, insbesondere eine vorzeitige Blütenbildung und/oder einen verstärkten Blütenansatz, erfolgt dabei vorzugsweise durch ein Verfahren, das folgende Schritte umfaßt:

- a) Herstellen einer Expressionskassette, die folgende DNA-Sequenzen umfaßt:
 - i) einen in pflanzlichen Zellen funktionalen Promotor, der die Transkription einer nachfolgenden DNA-Sequenz gewährleistet,
 - ii) mindestens eine DNA-Sequenz, die einen Saccharosetransporter codiert und in *sense*-Orientierung an das 3'-Ende des Promotors gekoppelt ist, und
 - iii) gegebenenfalls ein Terminationssignal für die Termination der Transkription und die Addition eines poly-A-Schwanzes an das entstehende Transkript, das an das 3'-Ende der codierenden Region gekoppelt ist,
- b) Transformation pflanzlicher Zellen mit der in Schritt a) hergestellten Expressionskassette und stabile Integration der Expressionskassette in das pflanzliche Genom, und
- c) Regeneration ganzer, intakter Pflanzen aus den transformierten Pflanzenzellen.

Für den unter i) genannten Promotor kommt im Prinzip jeder in Pflanzen funktionale Promotor in Betracht. Geeignet ist beispielsweise der 35S-Promotor des Cauliflower-Mosaik-Virus (Odell et al., Nature 313 (1985), 810-812), der eine konstitutive Expression in allen Geweben einer Pflanze gewährleistet und das in der WO/9401571 beschriebene Promotorkon-

strukt. Es können jedoch auch Promotoren verwendet werden, die nur zu einem durch äußere Einflüsse determinierten Zeitpunkt (siehe beispielsweise WO/9307279) oder in einem bestimmten Gewebe der Pflanze zu einer Expression nachfolgender Sequenzen führen (siehe z. B. Hadash et al., Plant Cell 4 (1992), 149-159, Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989), 2245-2251).

Die DNA-Moleküle, die eine codierende Region für einen Saccharosetransporter umfassen, können sowohl nativen bzw. homologen Ursprungs als auch fremden bzw. heterologen Ursprungs in bezug auf die zu transformierende Pflanzenspezies sein. Es können sowohl DNA-Moleküle verwendet werden, die aus prokaryontischen Organismen stammen, als auch solche, die aus eukaryontischen Organismen, insbesondere Pflanzen, stammen. Prokaryontische Sequenzen sind beispielsweise bekannt aus *E. coli* (Bockman et al., Mol. Gen. Genet. 235 (1992), 22-32; EMBL-Genbank: Zugriffsnummer X63740). Vorzugsweise werden DNA-Moleküle verwendet, die pflanzliche Saccharosetransporter codieren. Bekannt sind beispielsweise RNA bzw. DNA-Sequenzen aus *Arabidopsis thaliana* (suc 1- und suc 2-Gene; EMBL-Genbank: Zugriffsnummern X75365 bzw. X75382, sowie H36128, H36415, R64756, T76707 und T42333), *Solanum tuberosum* (Riesmeier et al., Plant Cell 5 (1993), 1591-1598; EMBL-Genbank: Zugriffsnummer X69165 und WO 94/00547), *Plantago major* (EMBL-Genbank: Zugriffsnummern X75764 bzw. X84379), *L. esculentum* (EMBL-Genbank: Zugriffsnummer X82275), *Nicotiana tabacum* (EMBL-Genbank: Zugriffsnummern X82276 und X82277), *R. communis* (EMBL-Genbank: Zugriffsnummer Z31561), *B. vulgaris* (EMBL-Genbank: Zugriffsnummer X83850) und Reis (EMBL-Genbank: Zugriffsnummern D40522 und D40515), die Saccharosetransporter codieren. Eine besondere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung sieht die Verwendung eines DNA-Moleküls aus *Spinacia oleracea* vor, das einen Saccharosetransporter codiert (siehe auch Riesmeier et al., EMBO J. 11 (1992), 4705-4713 und WO 94/00547).

Eine weitere bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens sieht vor, daß DNA-Moleküle verwendet werden, die Saccharosetransporter mit einem möglichst niedrigen K_m -Wert codieren. Eine derartiger Transporteraktivität ist beispielsweise aus *Candida albicans* (Williamson et al., Biochem. J. 291 (1993), 765-771) bekannt.

Bei den Molekülen, die Saccharosetransporter codieren, kann es sich sowohl um cDNA-Moleküle, als auch um genomische Sequenzen handeln. Die DNA-Moleküle können aus den entsprechenden Organismen mittels der gängigen Techniken isoliert werden, die dem Fachmann bekannt sind, beispielsweise Hybridisierung oder Polymerasekettenreaktion, oder sie können auf synthetischem Wege hergestellt werden.

Die unter iii) genannten Terminationssignale für die Transkription in pflanzlichen Zellen sind beschrieben und sind beliebig gegeneinander austauschbar. Verwendet werden kann beispielsweise die Terminationssequenz des Nopalinsynthase-Gens aus *Agrobacterium tumefaciens* (siehe z.B. Gielen et al., EMBO J. 8 (1989), 23-29). Die beschriebene Expressionskassette kann ebenfalls DNA-Sequenzen enthalten, die die Translation der codierenden Region in pflanzlichen Zellen verstärken.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann im Prinzip auf jede blütenbildende Pflanzenspezies angewendet werden. Vorzugsweise wird es auf die weiter unten angegebenen Pflanzen angewendet.

Gegenstand der Erfindung sind ferner transgene Pflanzen, die aufgrund der gesteigerten Aktivität des Saccharosetransporters, im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen ein verändertes Blühverhalten aufweisen, insbesondere eine vorzeitige Blütenbildung und Blüte und/oder einen verstärkten Blütenansatz.

Derartige transgene Pflanzen sind vorzugsweise durch das oben beschriebene Verfahren erhältlich. Das heißt, bei diesen Pflanzen beruht die Steigerung der Saccharosetranspor-

teraktivität vorzugsweise darauf, daß in die Pflanzen DNA-Moleküle eingeführt und exprimiert werden, die einen Saccharosetransporter codieren. Dabei handelt es sich vorzugsweise um DNA-Moleküle, die aus Pflanzen, Pilzen oder Bakterien stammen.

Bei den erfindungsgemäßen Pflanzen handelt es sich vorzugsweise um monokotyle oder dikotyle Nutzpflanzen, beispielsweise Getreidesorten (wie z.B. Gerste, Hafer, Roggen, Weizen etc.), Mais, Reis, Gemüsepflanzen (wie z.B. Tomate, Melone, Zucchini etc.), Baumwolle, Raps, Sojabohne, Obstarten (wie z.B. Pflaume, Apfel, Birne etc.), Zierpflanzen oder Schnittblumen.

Zur Vorbereitung der Einführung fremder Gene in höhere Pflanzen stehen eine große Anzahl von Clonierungsvektoren zur Verfügung, die ein Replikationssignal für *E.coli* und ein Markergen zur Selektion transformierter Bakterienzellen enthalten. Beispiele für derartige Vektoren sind pBR322, pUC-Serien, M13mp-Serien, pACYC184 usw. Die gewünschte Sequenz kann an einer passenden Restriktionsschnittstelle in den Vektor eingeführt werden. Das erhaltene Plasmid wird für die Transformation von *E.coli*-Zellen verwendet. Transformierte *E.coli*-Zellen werden in einem geeigneten Medium gezüchtet, anschließend geerntet und lysiert. Das Plasmid wird wiedergewonnen. Als Analysemethoden zur Charakterisierung der gewonnenen Plasmid-DNA werden im allgemeinen Restriktionsanalysen, Gelelektrophoresen und weitere biochemisch-molekularbiologische Methoden eingesetzt. Nach jeder Manipulation kann die Plasmid DNA gespalten und mit anderen DNA-Sequenzen verknüpft werden. Jede Plasmid-DNA-Sequenz kann in den gleichen oder anderen Plasmiden kloniert werden.

Zur Transformation pflanzlicher Zellen mit der in dem Verfahren beschriebenen Expressionskassette werden vorzugsweise Plasmide verwendet.

Für die Einführung von DNA in eine pflanzliche Wirtszelle stehen eine Vielzahl von Techniken zur Verfügung. Diese Techniken umfassen die Transformation pflanzlicher Zellen

mit T-DNA unter Verwendung von *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* als Transformationsmittel, die Fusion von Protoplasten, die Injektion, die Elektroporation von DNA, die Einbringung von DNA mittels der biolistischen Methode sowie weitere Möglichkeiten.

Bei der Injektion und Elektroporation von DNA in Pflanzenzellen werden an sich keine speziellen Anforderungen an die verwendeten Plasmide gestellt. Es können einfache Plasmide wie z.B. pUC-Derivate verwendet werden. Sollen aber aus derartig transformierten Zellen ganze Pflanzen regeneriert werden, ist die Anwesenheit eines selektierbaren Markergens notwendig.

Je nach Einführungsmethode gewünschter Gene in die Pflanzenzelle können weitere DNA-Sequenzen erforderlich sein. Werden z.B. für die Transformation der Pflanzenzelle das Ti- oder Ri-Plasmid verwendet, so muß mindestens die rechte Begrenzung, häufig jedoch die rechte und linke Begrenzung der Ti- und Ri-Plasmid T-DNA als Flankenbereich mit den einzuführenden Genen verbunden werden.

Werden für die Transformation Agrobakterien verwendet, muß die einzuführende DNA in spezielle Plasmide kloniert werden, und zwar entweder in einen intermediären Vektor oder in einen binären Vektor. Die intermediären Vektoren können aufgrund von Sequenzen, die homolog zu Sequenzen in der T-DNA sind, durch homologe Rekombination in das Ti- oder Ri-Plasmid der Agrobakterien integriert werden. Dieses enthält außerdem die für den Transfer der T-DNA notwendige *vir*-Region. Intermediäre Vektoren können nicht in Agrobakterien replizieren. Mittels eines Helferplasmids kann der intermediäre Vektor auf *Agrobacterium tumefaciens* übertragen werden (Konjugation). Binäre Vektoren können sowohl in *E.coli* als auch in Agrobakterien replizieren. Sie enthalten ein Selektionsmarker-Gen und einen *Linker* oder *Polylinker*, welche von der rechten und linken T-DNA Grenzregion eingerahmt werden. Sie können direkt in die Agrobakterien transformiert werden (Holsters et al., Mol. Gen. Genet. 163 (1978), 181-187)⁴. Das als Wirtszelle dienende Agrobakterium soll ein Plasmid, das

eine *vir*-Region trägt, enthalten. Die *vir*-Region ist für den Transfer der T-DNA in die Pflanzenzelle notwendig. Zusätzliche T-DNA kann vorhanden sein. Das derartig transformierte Agrobakterium wird zur Transformation von Pflanzenzellen verwendet.

Die Verwendung von T-DNA für die Transformation von Pflanzenzellen ist intensiv untersucht und ausreichend in EP 120516; Hoekema, In: The Binary Plant Vector System Offset-drukkerij Kanters B.V., Alblasterdam, Chapter V; Fraley et al., Crit. Rev. Plant. Sci., 4 (1985), 1-46 und An et al., EMBO J. 4 (1985), 277-287 beschrieben worden.

Für den Transfer der DNA in die Pflanzenzelle können Pflanzen-Explantate zweckmäßigerweise mit *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* kokultiviert werden. Aus dem infizierten Pflanzenmaterial (z.B. Blattstücke, Stengelsegmente, Wurzeln, aber auch Protoplasten oder Suspensions-kultivierte Pflanzenzellen) können dann in einem geeigneten Medium, welches Antibiotika oder Biozide zur Selektion transformierter Zellen enthalten kann, wieder ganze Pflanzen regeneriert werden. Die so erhaltenen Pflanzen können dann auf Anwesenheit der eingeführten DNA untersucht werden.

Ist die eingeführte DNA einmal im Genom der Pflanzenzelle integriert, so ist sie dort in der Regel stabil und bleibt auch in den Nachkommen der ursprünglich transformierten Zelle erhalten. Sie enthält normalerweise einen Selektionsmarker, der den transformierten Pflanzenzellen Resistenz gegenüber einem Biozid oder einem Antibiotikum wie Kanamycin, G 418, Bleomycin, Hygromycin oder Phosphinotricin u.a. vermittelt. Der individuelle gewählte Marker sollte daher die Selektion transformierter Zellen gegenüber Zellen, denen die eingeführte DNA fehlt, gestatten.

Die transformierten Zellen wachsen innerhalb der Pflanze in der üblichen Weise (siehe auch McCormick et al., Plant Cell Reports 5 (1986), 81-84). Die resultierenden Pflanzen können

normal angezogen werden und mit Pflanzen, die die gleiche transformierte Erbanlage oder andere Erbanlagen besitzen, gekreuzt werden. Die daraus entstehenden hybriden Individuen haben die entsprechenden phänotypischen Eigenschaften.

Es sollten zwei oder mehrere Generationen angezogen werden, um sicherzustellen, daß das phänotypische Merkmal stabil beibehalten und vererbt wird. Auch sollten Samen geerntet werden, um sicherzustellen, daß der entsprechende Phänotyp oder andere Eigenarten erhalten geblieben sind.

Fig. 1 zeigt das Plasmid pQA7DE-S21-Myc8.

- A= Fragment A: CaMV 35S-Promotor, nt 6909-7437 (Franck et al., Cell 21 (1980), 285-294). Im 5'-Bereich des Promotors wurden in die Nco I-Schnittstelle zwei 35S-Enhancerelemente (330 bp HincII/EcoRV-Fragment) inseriert.
- B= Fragment B: 73 bp langes Nco I/Asp 718-Fragment (TMV-U1) mit dem Translationsenhancer aus dem Tabakmosaik-Virus
- C= Fragment C: ca. 1600 bp langes DNA-Fragment, das die Nucleotide 70 bis 1644 der cDNA, die den Saccharose-transporter aus Spinat codiert (Riesmeier et al., EMBO J. 11 (1992), 4705-4713), umfaßt
- D= Fragment D: 33 bp langes DNA-Fragment, das die Aminosäuresequenz EQKLISEEDLN-COOH codiert
- E= Fragment E: Terminationssequenz des Octopinsynthase-Gens; nt 11748-11939 der T-DNA des Ti-Plasmids pTiACH5 (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984), 835-846)

Die Fragmente A, B, C, D und E befinden sich in dem Vektor pUC18. Das Plasmid hat eine Größe von ca. 5700 bp.

Fig. 2 zeigt das Plasmid pQ-S21.

- A= Fragment A: CaMV 35S-Promotor, nt 6909-7437 (Franck et al., Cell 21 (1980) 285-294). Im 5'-Bereich des Promotors wurden in die Nco I-Schnittstelle zwei 35S-Enhancerelemente (330 bp HincII/EcoRV-Fragment) inseriert.

- B= Fragment B: 73 bp langes Nco I/Asp 718-Fragment (TMV-U1) mit dem Translationsenhancer aus dem Tabakmosaik-Virus
- C= Fragment C: ca. 1600 bp langes DNA-Fragment, das die Nucleotide 70 bis 1644 der cDNA, die den Saccharose-transporter aus Spinat codiert (Riesmeier et al., EMBO J. 11 (1992), 4705-4713), umfaßt
- D= Fragment D: 33 bp langes DNA-Fragment, das die Aminosäuresequenz EQKLISEEDLN-COOH codiert
- E= Fragment E: Terminationssequenz des Octopinsynthase-Gens; nt 11748-11939 der T-DNA des Ti-Plasmids pTiACH5 (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984), 835-846)
- Das Plasmid hat eine Größe von ca. 12,6 kb

Fig. 3 zeigt das Plasmid p35 S- Ω -OCS

Fig. 4 a und b zeigen transformierte Tabakpflanzen im Vergleich mit nicht-transformierten Tabakpflanzen.

a: Drei Pflanzen der Tabaklinie 12, die mit dem Plasmid p Ω -S21 transformiert worden waren, (hinten) sind im Vergleich gezeigt mit zwei nicht-transformierten Tabakpflanzen (vorne). Die Pflanzen sind ca. 128 Tage alt und wurden im Phytotron gehalten.

b: Drei Pflanzen der Tabaklinie 32, die mit dem Plasmid p Ω -S21 transformiert worden waren, (hinten) sind im Vergleich gezeigt mit zwei nicht-transformierten Tabakpflanzen (vorne). Die Pflanzen sind ca. 128 Tage alt und wurden im Phytotron gehalten.

Fig. 5 zeigt als Balkendiagramm die durchschnittliche Anzahl der Tage zwischen dem Transfer der Pflanzen aus der Gewebekultur in Erde bis zum Öffnen der ersten Blüte. Es wurden jeweils 12 Pflanzen pro Genotyp unter folgenden Lichtbedingungen in einer Pflanzenwuchskammer angezogen.

7- 9 Uhr	300 $\mu\text{mol Quanten m}^2\text{sec}^{-1}$
9-11 Uhr	600 $\mu\text{mol Quanten m}^2\text{sec}^{-1}$
11-13 Uhr	900 $\mu\text{mol Quanten m}^2\text{sec}^{-1}$
13-17 Uhr	1200 $\mu\text{mol Quanten m}^2\text{sec}^{-1}$
17-19 Uhr	900 $\mu\text{mol Quanten m}^2\text{sec}^{-1}$
19-21 Uhr	600 $\mu\text{mol Quanten m}^2\text{sec}^{-1}$
21-23 Uhr	300 $\mu\text{mol Quanten m}^2\text{sec}^{-1}$

Fig. 6 zeigt als Balkendiagramm die durchschnittliche Anzahl der Tage zwischen dem Transfer der Pflanzen aus der Gewebekultur in Erde bis zum Öffnen der ersten Blüte. Es wurden jeweils 12 Pflanzen pro Genotyp unter folgenden Lichtbedingungen in einer Pflanzenwuchskammer angezogen. Die Linien 32, 12, 5 und 1 sind 4 unabhängige transgene Linien, die mit dem Plasmid p Ω -S21 transformiert worden waren.

7-23 Uhr 400-500 $\mu\text{mol Quanten m}^{-2}\text{sec}^{-1}$

Fig. 7 zeigt als Balkendiagramm die durchschnittliche Anzahl der Blattansätze bis zur Ausbildung der Blüten. Versuchsbedingungen siehe Fig. 6.

In den Beispielen verwendete Medien und Lösungen

20 x SSC 175.3 g NaCl
 88.2 g Natrium-Citrat
 ad 1000 ml mit ddH₂O
 pH 7,0 mit 10 N NaOH

10 x MEN 200 mM MOPS
 50 mM Natriumacetat
 .10 mM EDTA
 pH 7, 0

NSEB-Puffer 0,25 M Natriumphosphatpuffer pH 7,2
 7 % SDS
 1 mM EDTA
 1 % BSA (Gew./Vol.)

4 x Laemmli-Puffer

200 mM Tris pH 6,8

8 % SDS

0.4 % Bromphenolblau

40 % Glycerin

In den Beispielen verwendete Methoden:

1. Clonierungsverfahren

Zur Clonierung in *E.coli* wurde der Vektor pUC18 verwendet. Für die Pflanzentransformation wurden die Genkonstruktionen in den binären Vektor pBinAR (Höfgen und Willmitzer, Plant Sci. 66 (1990), 221-230) cloniert.

2. Bakterienstämme

Für die pUC-Vektoren und für die pBinAR-Konstrukte wurde der *E.coli*-Stamm DH5 α (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburgh, USA) verwendet.

Die Transformation der Plasmide in die Tabakpflanzen wurde mit Hilfe des *Agrobacterium tumefaciens*-Stammes C58C1 pGV2260 durchgeführt (Deblaere et al., Nucl. Acids Res. 13 (1985), 4777-4788).

3. Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Der Transfer der DNA erfolgte durch direkte Transformation nach der Methode von Höfgen&Willmitzer (Nucleic Acids Res. 16 (1988), 9877). Die Plasmid-DNA transformierter Agrobakterien wurde nach der Methode von Birnboim&Doly (Nucleic Acids Res. 7 (1979), 1513-1523) isoliert und nach geeigneter Restriktionsspaltung gelelektrophoretisch analysiert.

4. Transformation von Tabak

Eine Übernachtskultur des entsprechenden *Agrobacterium tumefaciens*-Clons wurde abzentrifugiert (6500 rpm; 3 min) und die Bakterien wurden in YEB-Medium resuspendiert.

Tabakblätter einer Tabaksterilkultur (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN) wurden in kleine ca. 1 cm² große Stücke zerschnitten und in der Bakteriensuspension gebadet. Die Blattstücke wurden anschließend auf MS-Medium (0,7 % Agar) gelegt und 2 Tage im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Blattstücke zur Sproßinduktion auf MS-Medium (0,7 % Agar) mit 1,6 % Glukose, 1 mg/l 6-Benzylaminopurin, 0,2 mg/l Naphthylelessigsäure, 500 mg/l Claforan und 50 mg/l Kanamycin gelegt. Das Medium wurde alle 7 bis 10 Tage gewechselt. Wenn sich Sprosse entwickelt hatten, wurden die Blattstücke in Glasgefäße, die dasselbe Medium, enthielten, überführt. Entstehende Sprosse wurden abgeschnitten und auf MS-Medium + 2 % Saccharose + 250 mg/l Claforan gegeben und aus ihnen ganze Pflanzen regeneriert.

5. Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Die radiokative Markierung von DNA-Fragmenten wurde mit Hilfe eines DNA-Random Primer Labelling Kits der Firma Boehringer (Deutschland) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

6. Northern Blot-Analyse

RNA wurde nach Standardprotokollen aus Blattgewebe von Pflanzen isoliert. 50 µg der RNA wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt (1,5 % Agarose, 1 x MEN-Puffer, 16,6 % Formaldehyd). Das Gel wurde nach dem Gellauf kurz in Wasser gewaschen. Die RNA wurde mit 20 x SSC mittels Kapillarblot auf eine Nylonmembran vom Typ Hybond N (Amersham UK) transferiert. Die Membran wurde anschließend bei 80°C unter Vakuum für zwei Stunden gebacken.

Die Membran wurde in NSEB-Puffer für 2 h bei 68°C prähybridisiert und anschließend in NSEB-Puffer über Nacht bei 68°C in Gegenwart der radioaktiv markierten Probe hybridisiert.

7. Isolierung von Proteinen aus Blattgewebe und Western Blot-Analyse

Für die Isolierung von Proteinen aus Blattgewebe wurden 2 kreisrunde Blattstücke mit einem Durchmesser von ca. 5 mm aus Tabakblättern ausgestanzt und in 100 µl 4x Laemmli-Puffer, 5 % β -Mercaptoethanol in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß zerkleinert. Die entstehende Suspension wurde kurz abzentrifugiert. 10 µl des Überstandes wurden direkt auf ein "Mighty Small" SDS-Polyacrylamid-Gel der Firma Höfer (Trenngel 10 % Polyacrylamid; Sammelgel 3,5 % Polyacrylamid) aufgetragen und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine mit Hilfe der Semidry-Elektroblot-Methode auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Identifizierung des Saccharosetransporters aus Spinat in den Extrakten transgener Tabakpflanzen erfolgte unter Verwendung eines "Blotting detection kit- for rabbit antibodies" (Amersham UK) nach den Angaben des Herstellers. Als primärer Antikörper wurde der monoclonale Antikörper aus Maus 9E10 (Kolodziej und Young, In: Methods in Enzymology 194 (1991), 508-519) verwendet, der gegen das in Fig. 1 als Fragment D gezeigte myc-Epitop gerichtet ist.

8. Pflanzenhaltung

Im Gewächshaus: Lichtperiode 14 h bei 1300 Lux und 25°C
.Dunkelperiode 10 h bei 20 °C

Luftfeuchte 60 %

Im Phytotron: Lichtperiode 15 h bei 800 mEinstein/m²/sec
bei 25 °C
Dunkelperiode 9 h bei 22 °C

Luftfeuchte 80 %

Die Beispiele erläutern die Erfindung.

Beispiel 1

Konstruktion des Plasmides pΩ-S21 und Einführung des Plasmids in das Genom von Tabakpflanzen

Zur Konstruktion eines Plasmides, das zur Transformation pflanzlicher Zellen geeignet ist und zur Überexpression eines Saccharosetransporters in pflanzlichen Zellen führt, wurde zunächst die codierende Region einer cDNA, die einen Saccharosetransporter aus Spinat codiert, isoliert. Hierfür wurde der Clon pS21 (beschrieben in Riesmeier et al., EMBO J. 11 (1992), 4705-4713) verwendet. Unter Verwendung der Oligonucleotide

(1) 5'-GAGACTGCAGCCATGGCAGGAAGAAATATATAAAAAATGGTG-3'

(Seq ID No. 1) und

(2) 5'-GAGACTGCAGTCAGTTGAGGTCTTCTTCGGAGATTAGTTTTTGTTC

ATGACCACCCATGGACCCACCAATTTTAGC-3' (Seq ID No. 2)

wurde mit Hilfe der PCR-Technologie ein ca 1600 bp langes DNA-Fragment amplifiziert, das die Nucleotide 70 bis 1644 der in Riesmeier et al. (EMBO J. 11 (1992), 4705-4713) dargestellten Sequenz des Clons pS21 umfaßt. Durch das Oligonucleotid (1) wurden am 5'-Ende der codierenden Region eine Pst I- und eine Noc I-Schnittstelle eingeführt. Durch das Oligonucleotid (2) wurde die codierende Region um eine 11 Aminosäuren lange Sequenzen (EQKLISEEDLN-COOH (Seq ID No. 3)) am C-Terminus verlängert und außerdem eine Pst I-Schnittstelle eingeführt. Diese Sequenz stammt aus dem c-Myc-Gen und stellt das Erkennungsepitop für den monoclonalen Antikörper aus Maus 9E10 (Kolodziej und Young, In: Methods

in Enzymology 194 (1991), 508-519; kommerziell erhältlich bei Dianova, Hamburg) dar.

Das resultierende PCR-Produkt wurde mit der Restriktionsendonuclease Pst I geschnitten und in einen mit Pst I geschnittenen pUC18-Vektor ligiert. Das resultierende Plasmid wurde p-S21-Myc8 genannt. Aus diesem wurde durch Nco I/Pst I-Partialverdau ein ca. 1600 bp langes Fragment isoliert, das das PCR-Produkt enthält, und in den mit Nco I und Pst I geschnittenen Vektor p35SDE- Ω -OCS ligiert wurde.

Der Vektor p35SDE- Ω -OCS wurde folgendermaßen hergestellt:

Aus dem Promotorbereich des Cauliflower Mosaic Virus wurde ein 530 bp langes EcoR I/Asp718-Fragment (Nucleotide 6909-7439 (Franck et al. Cell 21 (1980), 285-294)) isoliert und in einen mit EcoR I und Asp718 geschnittenen pUC18-Vektor ligiert. Das entstehende Plasmid wurde p35S genannt. Anschließend wurde aus dem EcoR I/Asp718-Promotorfragment durch Restriktionsverdau mit den Endonucleasen Hinc II und EcoR V ein ca. 330 bp langes Fragment isoliert. Dieses Fragment wurde anschließend in die aufgefüllte Nco I-Schnittstelle des 35S-Promotors in dem Plasmid p35S cloniert. Hierbei entstand ein Konstrukt, bei dem zwei Hinc II/EcoR V-Fragmente hintereinander in reverser Orientierung in der Nco I-Schnittstelle inseriert waren, wobei die Anordnung folgende war:

EcoRI----- (NcoI) / (EcoRV) ---330bp--- (HincII) / (EcoRV) ---
330bp--- (HincII) / (NcoI) -----525 bp---Asp718

Das resultierende Plasmid wurde p35SDE genannt. Der in diesem Fragment enthaltene 35S-Promotor mit zwei zusätzlichen Hinc II/EcoR V-Fragmenten wurde mit 35SDE bezeichnet.

Es wurde ein weiteres pUC-Plasmid konstruiert, das wie in Figur 3 gezeigt aufgebaut ist. Zwischen die EcoR I und die Hind III-Schnittstellen des Polylinkers eines pUC18-Vektors wurden folgende DNA-Fragmente inseriert:

1. EcoR I/Asp718-Fragment des 35S-Promotors (Nucleotide 6909-7439 (Franck et al., Cell 21 (1980), 285-294))
2. Asp718/Nco I-Fragment (TMV-U1) aus dem Ω -Translationsenhancer des Tabakmosaik-Virus mit der folgenden Sequenz:

5'-GGTACCTTTACAACAATTACCAACAACAACAACAACAACAT
TACAATTACTATTTACAATTACCATGG-3' (Seq ID No. 4)

3. ein Polylinker mit folgenden Restriktionsschnittstellen

Nco I/Sac I/Xho I/Sma I/BamH I/Xba I/Sal I/Pst I/Sph I

4. eine Terminationssequenz aus dem Octopinsynthesegen (nt 11748-11939 der T-DNA des Ti-Plasmids pTiACH5 (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984), 835-846)

Dieses Plasmid wurde p35S- Ω -OCS genannt.

Das Plasmid p35S- Ω -OCS wurde mit EcoR I/Asp718 geschnitten, wodurch der 35S-Promotor entfernt wurde. Dieser wurde durch den mit EcoR I und Asp718 aus dem Plasmid p35SDE isolierten Promotor 35SDE ersetzt. Das resultierende Plasmid wurde p35SDE- Ω -OCS genannt.

Dieses Plasmid wurde mit Nco I und Pst I im Polylinker geschnitten. In die Schnittstellen wurde das aus dem Plasmid p-S21-Myc8 durch Partialverdau mit Nco I und Pst I isolierte ca. 1600 bp lange Fragment, das das obenbeschriebene PCR-Produkt enthält, ligiert. Dadurch entstand das Plasmid pQA7DE-S21-Myc8. Dieses Plasmid ist in Figur 1 dargestellt.

Aus dem Plasmid pQA7DE-S21-Myc8 wurde durch Verdau mit EcoR I und Hind III die gesamte Expressionskassette umfassend den Promotor 35SDE, den Translationsverstärker, die den Saccharosetransporter aus Spinat codierende Region mit der Sequenz, die das c-Myc-Epitop codiert, und der Terminationssequenz isoliert.

Diese Sequenz wurde in den mit EcoR I und Hind III geschnittenen Vektor TCSAS (hinterlegt bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen in Braunschweig, Deutschland, am 10. August 1994 unter der Hinterlegungsnummer DSM 9359) ligiert, aus dem zuvor durch den EcoR I/Hind III-Verdau die zwischen diesen beiden Restriktionsschnittstellen enthaltene Expressionskassette entfernt wurde.

Das resultierende Plasmid wurde p Ω -S21 genannt und ist in Figur 2 dargestellt.

Beispiel 2

Transformation von Tabakpflanzen mit dem Plasmid p Ω -S21

Das Plasmid p Ω -S21 wurde für die Transformation von Tabakpflanzen mit Hilfe des Agrobakterien-vermittelten Gentransfers verwendet.

Als Ergebnis der Transformation ließ sich in transgenen Tabakpflanzen in verschiedenen Mengen das den Saccharosetransporter aus Spinat codierende Transkript nachweisen. Der Nachweis erfolgte mit Hilfe einer Northern-Blot-Analyse. Hierfür wurde RNA aus Blattgewebe transgener und nicht-transformierter Pflanzen isoliert. 50 μ g dieser RNA wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit der radioaktiv markierten cDNA, die den Saccharosetransporter aus Spinat codiert, hybridisiert. Eine derartige Northern-Blot-Analyse zeigte, daß von drei Transformanten (Transformanten Nr. 5, 12 und 32) zwei Transformanten (Nr. 12 und Nr. 32) eine hohe Expression des Saccharosetransporters aus Spinat aufweisen, eine Transformante (Nr. 5) im Vergleich dazu nur eine relativ geringe Expression des Saccharosetransporters aus Spinat zeigt, und sich in nicht-transformierte Kartoffelpflanzen keine Transkripte nachweisen ließen, die den Saccharosetransporter aus Spinat codierten.

Um zu zeigen, daß das Transkript, das einen Saccharosetransporter aus Spinat codiert, in transgenen Tabakpflanzen zur Synthese eines Saccharosetransporters führt, wurde eine Western-Blot-Analyse durchgeführt. Dazu wurden aus Blattgewebe transgener Pflanzen Proteine isoliert, auf einem SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Nachweis des Spinat-Saccharosetransporters in transgenen Tabakpflanzen erfolgte mit Hilfe von monoclonalen

Antikörpern, die gegen das Epitop des c-Myc-Gens gerichtet sind, das von dem 3'-Ende der codierenden Region in dem Plasmid p Ω -S21 codiert wird.

In derartigen Western Blot-Analysen ließ sich spezifisch in Proteinextrakten transgener Tabakpflanzen ein ca. 48 kD großes Protein nachweisen. Dies entspricht dem erwarteten Molekulargewicht des Saccharosetransporters aus Spinat.

Infolge der Expression des Saccharosetransporters aus Spinat wiesen die mit dem Plasmid p Ω -S21 transformierten Tabakpflanzen im Vergleich zu nicht-transformierten Tabakpflanzen ein verändertes Blühverhalten auf. Insbesondere war bei den Transformanten 12 und 32, die eine starke Expression des Spinat-Saccharosetransporters zeigten, eine vorzeitige Blütenbildung sowie ein leicht verstärkter Blütenansatz zu beobachten.

Transformierte Tabakpflanzen zeigten im Vergleich zu nicht-transformierten Pflanzen deutlich weniger Blattansätze, bevor die Induktion des apikalen Meristems zur Bildung der Blütenstände einsetzt. In Tabelle I ist dargestellt, wieviele Blattansätze ca. 128 Tage alte transformierte bzw. nicht-transformierte Tabakpflanzen, die im Phytotron gehalten wurden, vor der Differenzierung des apikalen Meristems zu Blütenständen durchschnittlich aufwiesen.

Tabelle I

transformierte Tabaklinie Nr.	durchschnittliche Anzahl der Blattansätze
5	17,8
12	18
32	17,3
nicht-transformierte Pflanzen	20,7

Durch die vorzeitige Induktion des Meristems zur Bildung von Blütenständen kommt es zur vorzeitigen Bildung von Knospen und zur vorzeitigen Blüte im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen. Dies veranschaulichen auch die Figuren 4a und b, die im Phytotron gehaltene transformierte Tabakpflanzen der Linie 12 (Fig. 4a) bzw. der Linie 32 (Fig. 4b) im Vergleich zu nicht-transformierten Tabakpflanzen zeigen. Unter gleichen Kultivierungsbedingungen setzte bei nicht-transformierten Tabakpflanzen die Blütenbildung und Blüte deutlich später ein, im Durchschnitt ca. 14 Tage bei im Phytotron gehaltenen Pflanzen.

Neben der vorzeitigen Blütenbildung setzten die transformierten Pflanzen im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen zahlenmäßig mehr Blüten an. Dies ist in Tabelle II dargestellt.

Tabelle II

transformierte Tabaklinie Nr.	durchschnittliche Anzahl der Blüten pro Pflanze
5	112
12	170
32	133
nicht-transformierte Pflanzen	103

Die untersuchten Pflanzen waren ca. 128 Tage alt und waren im Phytotron gehalten worden.

Die oben beschriebenen Ergebnisse wurden in einem Wiederholungsversuch bestätigt, bei dem Pflanzen der transformierten Linien 32, 12, 5 und 1 untersucht wurden. Die Ergebnisse sind in den Figuren 5, 6 und 7 dargestellt.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Institut fuer Genbiologische Forschung Berlin
GmbH
- (B) STRASSE: Ihnestr. 63
- (C) ORT: Berlin
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 14195
- (G) TELEFON: +49 30 8300070
- (H) TELEFAX: +49 30 83000736

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Verfahren zur Veraenderung des
Bluehverhaltens bei Pflanzen

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 4

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRAEGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(v) DATEN DER JETZIGER ANMELDUNG:

ANMELDENUMMER: DE P4439748.8

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 42 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "oligonucleotide"

(iii) HYPOTHETISCH: JA

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

GAGACTGCAG CCATGGCAGG AAGAAATATA TAAAAAATGG TG

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 76 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "oligonucleotide"

(iii) HYPOTHETISCH: JA

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

GAGACTGCAG TCAGTTGAGG TCTTCTTCGG AGATTAGTTT TTGTTTCATGA CCACCCATGG
60

ACCCACCAAT TTTAGC
76

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 11 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: JA

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

Glu	Gln	Lys	Leu	Ile	Ser	Glu	Glu	Asp	Leu	Asn
1				5					10	

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 73 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

- (A) BESCHREIBUNG: /desc = "oligonucleotide"

(iii) HYPOTHETISCH: JA

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

GGTACCTTTA CAACAATTAC CAACAACAAC AAACAACAAA CAACATTACA ATTACTATTT
60

ACAATTACCA TGG
73

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Verwendung von DNA-Molekülen, die Proteine mit der biologischen Aktivität eines Saccharosetransporters codieren, zur Veränderung des Blühverhaltens bei Pflanzen.
2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei die Veränderung des Blühverhaltens auf einer Steigerung der Aktivität des Saccharosetransporters beruht.
3. Verwendung nach Anspruch 2, wobei das Blühverhalten so verändert ist, daß eine vorzeitige Blütenbildung und Blüte erfolgt.
4. Verwendung nach Anspruch 2 oder 3, wobei das Blühverhalten so verändert ist, daß ein verstärkter Blütenansatz erfolgt.
5. Verwendung nach einem der Ansprüche 2 bis 4, wobei die Steigerung der Aktivität des Saccharosetransportes dadurch erfolgt, daß in Pflanzen DNA-Moleküle eingebracht und exprimiert werden, die einen Saccharosetransporter codieren.
6. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei das DNA-Molekül einen pflanzlichen Saccharosetransporter codiert.
7. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei das DNA-Molekül einen Saccharosetransporter aus einem Pilz codiert.
8. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei das DNA-Molekül einen bakteriellen Saccharosetransporter codiert.

9. Verfahren zur Veränderung des Blühverhaltens bei Pflanzen, dadurch gekennzeichnet, daß in Pflanzen die Aktivität des Saccharosetransporters erhöht wird.
10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei die Steigerung der Saccharosetransporteraktivität dadurch erreicht wird, daß in Pflanzen DNA-Moleküle eingebracht und exprimiert werden, die einen Saccharosetransporter codieren.
11. Verfahren nach Anspruch 10, wobei das DNA-Molekül einen pflanzlichen Saccharosetransporter codiert.
12. Verfahren nach Anspruch 10, wobei das DNA-Molekül einen Saccharosetransporter aus einem Pilz codiert.
13. Verfahren nach Anspruch 10, wobei das DNA-Molekül einen bakteriellen Saccharosetransporter codiert.
14. Transgene Pflanze mit einem im Vergleich zur Wildtyp-Pflanze veränderten Blühverhalten, dadurch gekennzeichnet, daß die Pflanze im Vergleich zur Wildtyp-Pflanze eine gesteigerte Saccharosetransporteraktivität aufweist.
15. Transgene Pflanze nach Anspruch 14, bei der das Blühverhalten so verändert ist, daß es im Vergleich zur Wildtyp-Pflanze zu einer vorzeitigen Blütenbildung und Blüte kommt.
16. Transgene Pflanze nach Anspruch 14 oder 15, bei der das Blühverhalten derart verändert ist, daß es im Vergleich zur Wildtyp-Pflanze zu einem verstärkten Blütenansatz kommt.
17. Transgene Pflanze nach einem der Ansprüche 14 bis 16, wobei die Steigerung der Saccharosetransporteraktivität

durch Einführung und Expression von DNA-Molekülen erzielt wird, die einen Saccharosetransporter codieren.

18. Transgene Pflanze nach Anspruch 17, wobei das DNA-Molekül einen pflanzlichen Saccharosetransporter codiert.
19. Transgene Pflanze nach Anspruch 17, wobei das DNA-Molekül einen Saccharosetransporter aus einem Pilz codiert.
20. Transgene Pflanze nach Anspruch 17, wobei das DNA-Molekül einen bakteriellen Saccharosetransporter codiert.

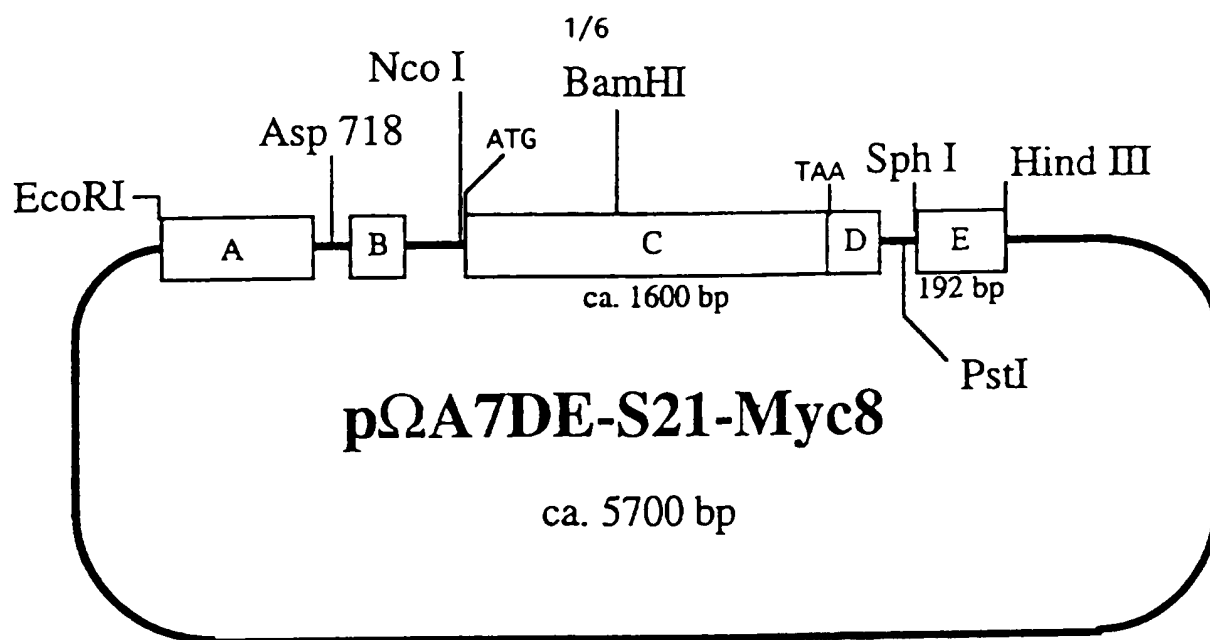


Fig. 1

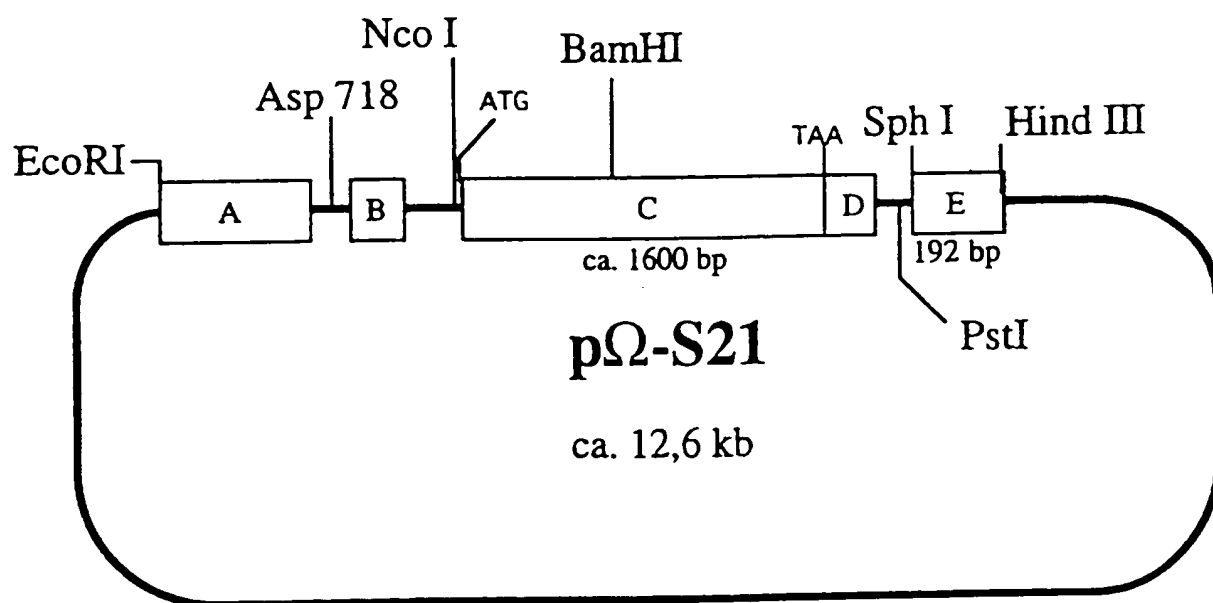


Fig. 2

2/6

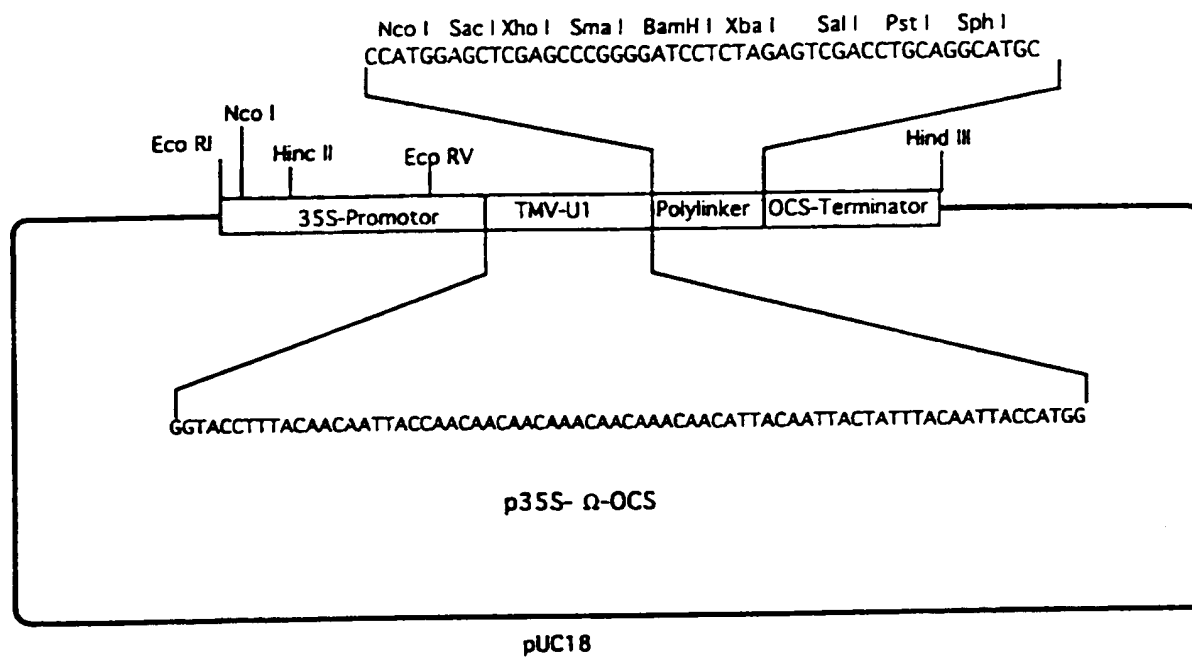


Fig. 3

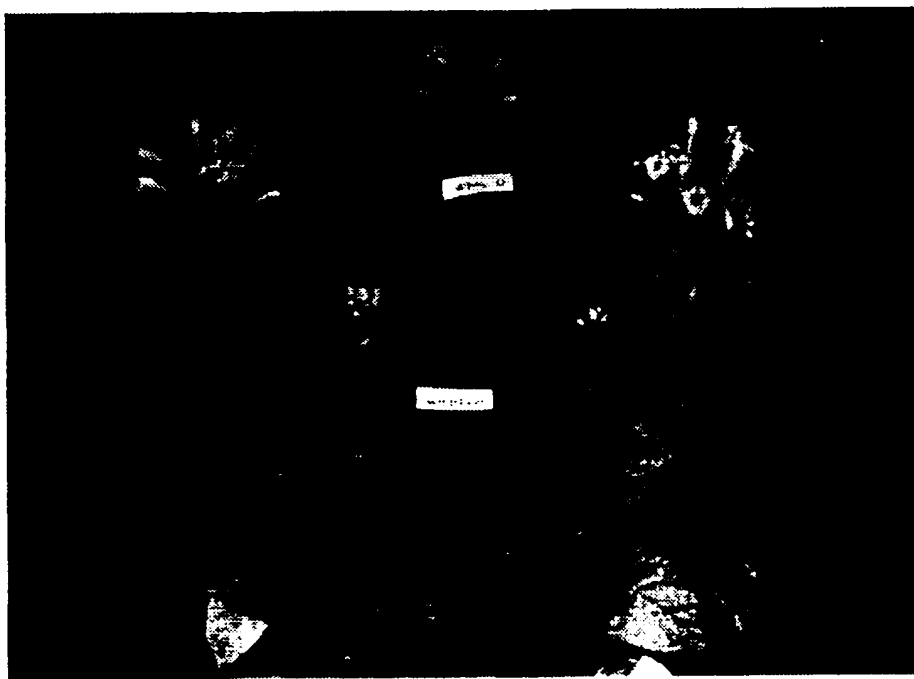


Fig. 4a

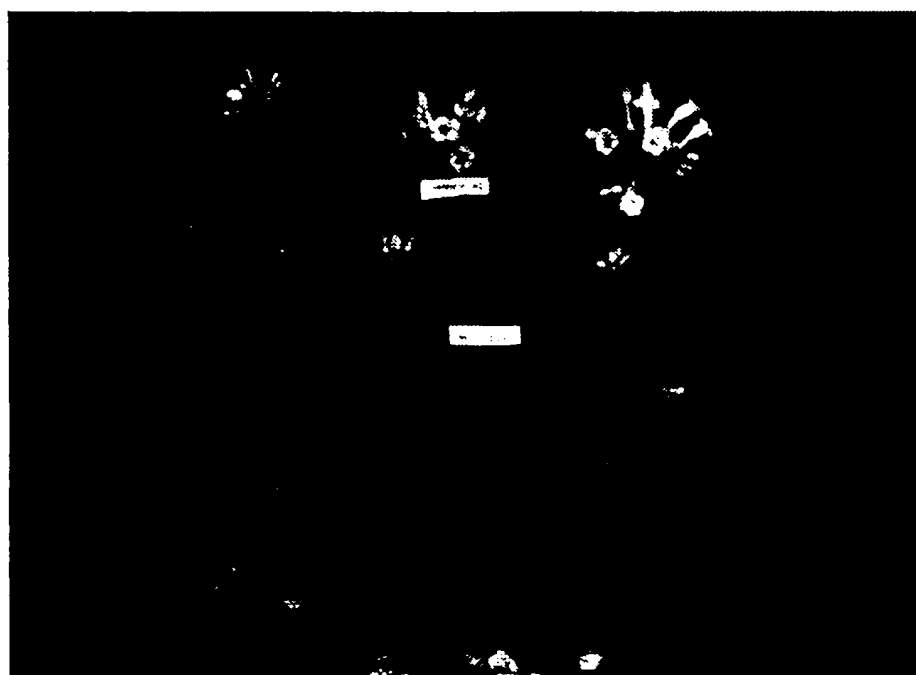
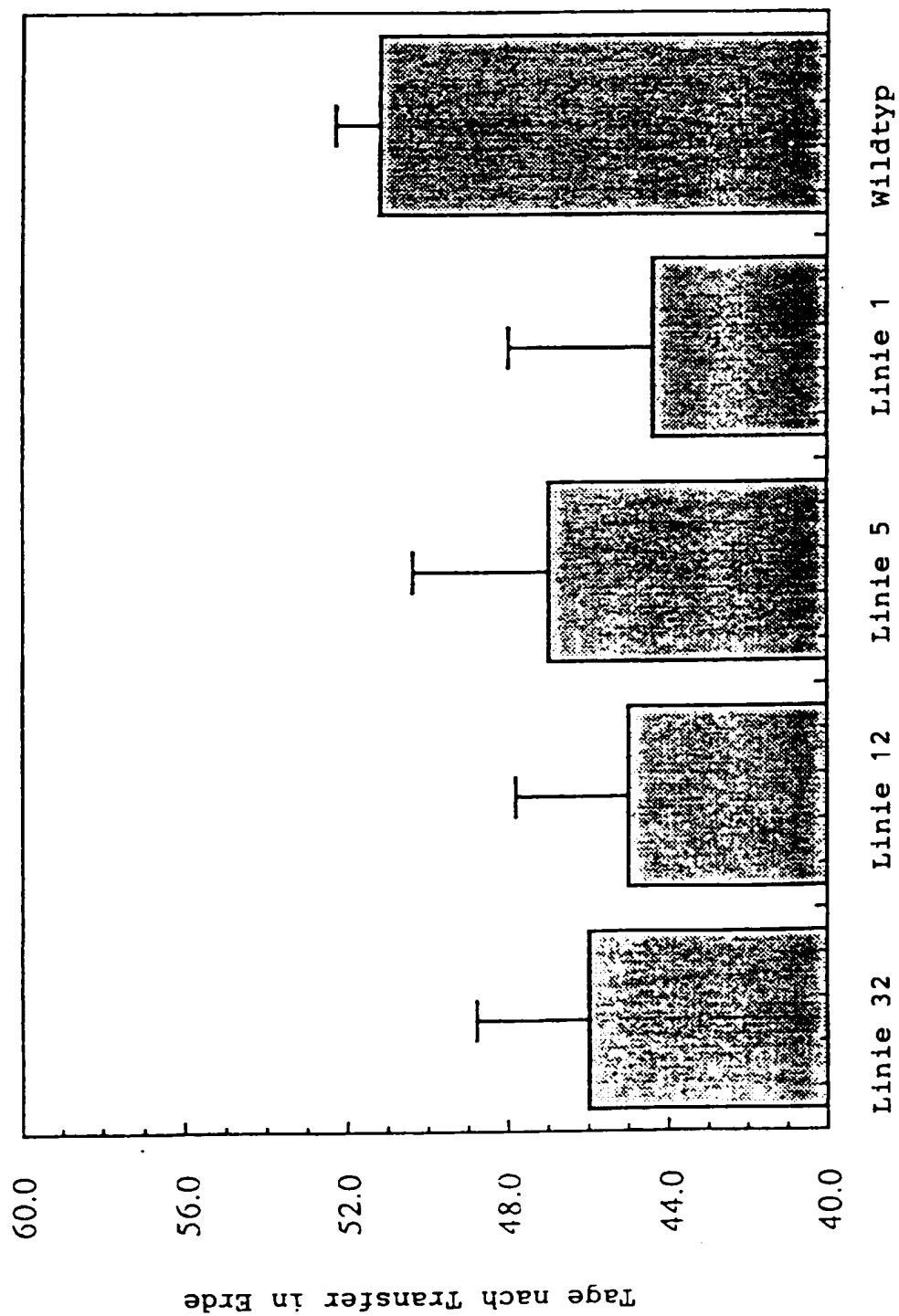


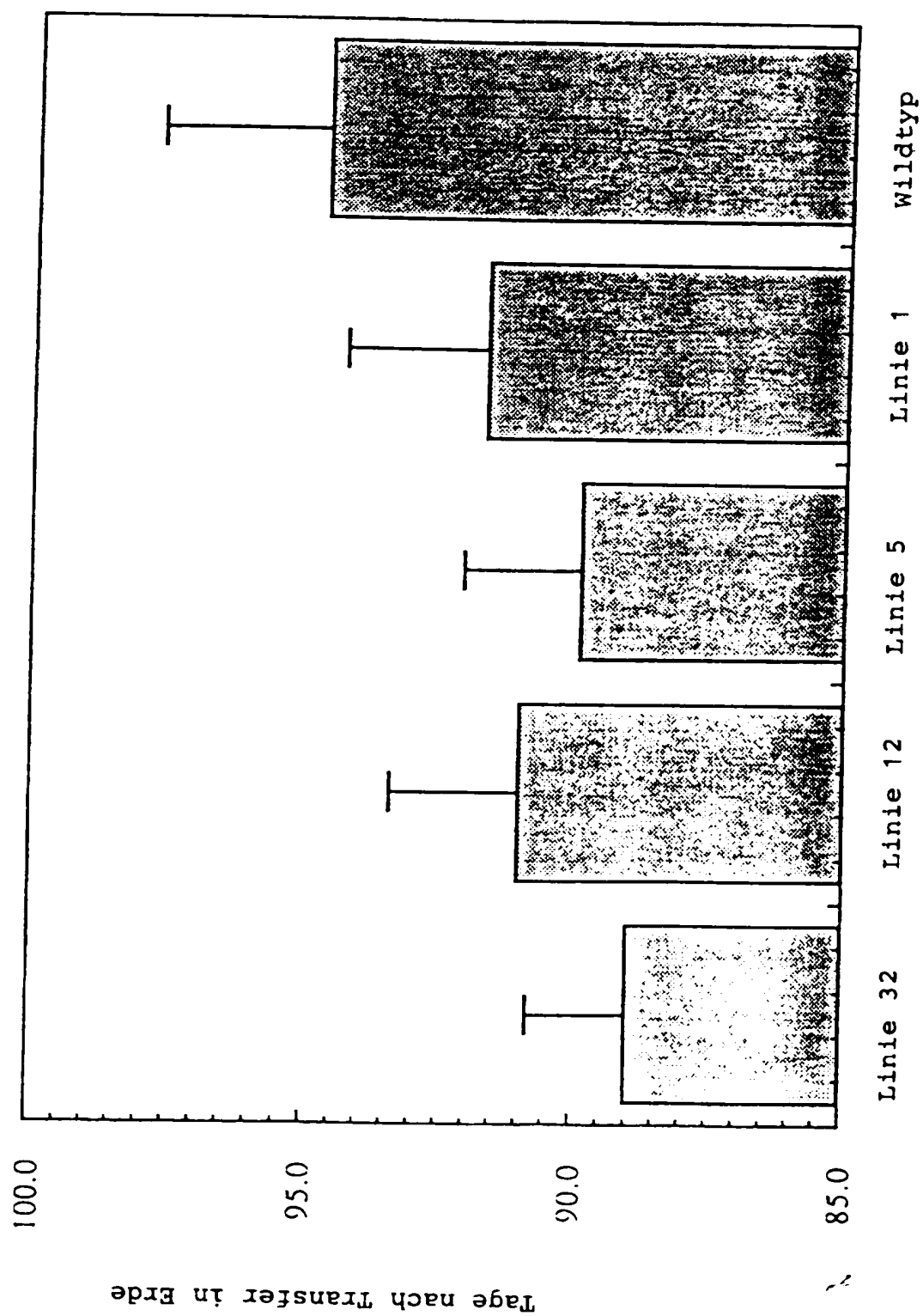
Fig. 4b

4/6

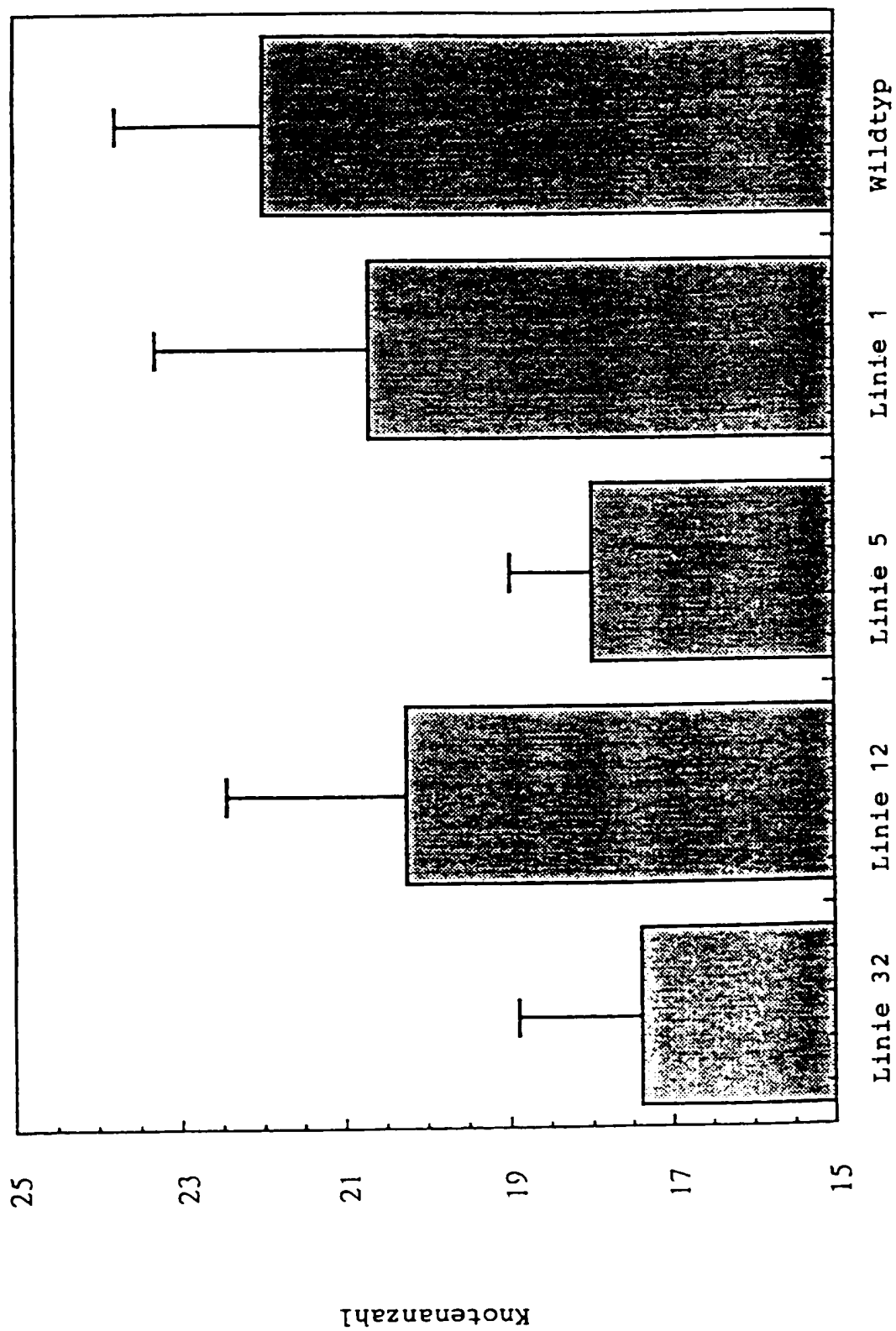


Figur 5

5/6



Figur 6



Figur 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No

PCT/EP 95/04257

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/82 C12N15/29 A01H5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N A01H

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO,A,94 00574 (INST GENBIOLOGISCHE FORSCHUNG ;FROMMER WOLF BERND (DE); RIESMEIER) 6 January 1994 cited in the application see the whole document ---	1-20
A	THE EMBO JOURNAL, vol. 13, January 1994 pages 1-7, RIESMEIER, J.W., ET AL. 'Evidence for an essential role of the sucrose transporter in phloem loading and assimilate partitioning' cited in the application see the whole document ---	1-20

-/--

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *A* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 March 1996

Date of mailing of the international search report

22 MARCH 1996

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,

Authorized officer

Maddox A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No
PCT/EP 95/04257

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>THE PLANT CELL, vol. 5, October 1993 pages 1147-1155, BERNIER, G., ET AL. 'Physiological signals that induce flowering' cited in the application see page 1148, right column - page 1149, left column see page 1152</p> <p>-----</p>	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 95/04257

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
---	---------------------	----------------------------	---------------------

WO-A-9400574

06-01-94

DE-A- 4220759

05-01-94

AU-B- 4500393

24-01-94

CA-A- 2137346

06-01-94

EP-A- 0647273

12-04-95

HU-A- 70472

30-10-95

JP-T- 7509123

12-10-95

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 95/04257

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12N15/82 C12N15/29 A01H5/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C12N A01H

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO, A, 94 00574 (INST GENBIOLOGISCHE FORSCHUNG ; FROMMER WOLF BERND (DE); RIESMEIER) 6. Januar 1994 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-20
A	THE EMBO JOURNAL, Bd. 13, Januar 1994 Seiten 1-7, RIESMEIER, J.W., ET AL. 'Evidence for an essential role of the sucrose transporter in phloem loading and assimilate partitioning' in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-20

-/--

☒ Weitere Veröffentlichungen und der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- * "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
 - * "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
 - * "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
 - * "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
 - * "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
 - * "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
 - * "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
 - * "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nabelegend ist
 - * "Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

11. März 1996

Abschließdatum des internationalen Recherchenberichts

22. 03. 96

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 eno nl

Bevollmächtigter Beauftragter

Madison A

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. zoonales Aktenzeichen

PCT/EP 95/04257

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>THE PLANT CELL, Bd. 5, Oktober 1993 Seiten 1147-1155, BERNIER, G., ET AL. 'Physiological signals that induce flowering' in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 1148, rechte Spalte - Seite 1149, linke Spalte siehe Seite 1152</p> <p>-----</p>	1-20

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 95/04257

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
--	-------------------------------	-----------------------------------	-------------------------------

WO-A-9400574	06-01-94	DE-A- 4220759	05-01-94
		AU-B- 4500393	24-01-94
		CA-A- 2137346	06-01-94
		EP-A- 0647273	12-04-95
		HU-A- 70472	30-10-95
		JP-T- 7509123	12-10-95
